DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.07.006
第23卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 7
2001年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2001

文章编号:1000-5404(2001)07-0765-03

论著

酵母表面呈现的人 CD55 的鉴定

郭 波,谢佩蓉,邹 强,郑 萍,杨 劲 (第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 鉴定酵母细胞表面呈现的人CD55,探讨诱导时间对呈现的影响。方法 PCR从CD55-pBluescript M13质粒扩增出全长的CD55 cDNA,酶切后克隆到酵母表面呈现载体pYD1,构建CD55-pYD1重组质粒后,转化酵母细胞。抗CD55单抗间接荧光标记染色法检测所呈现CD55的免疫学活性。通过FACS检测人血清处理后酵母表面C_{5b-9}的沉积探讨CD55的生物学活性。同时还用FACS检测了不同诱导时间呈现CD55的细胞的百分率。结果 酵母表面呈现的CD55分子能与抗CD55不同表位的单抗结合,并且能减少细胞表面C_{5b-9}的沉积。在诱导20 h左右表面呈现CD55的细胞百分率达最高。结论 在酵母细胞表面呈现的CD55分子具有免疫学和生物学活性,对酵母呈现CD55的最佳诱导时间为20 h。

关键词:CD55;补体调节蛋白;酵母表面呈现
中图法分类号:R392.12 文献标识码:A

Identification of human CD55 displayed on the surface of yeast

GUO Bo, XIE Pei-rong, ZOU Qiang, ZHENG Ping, YANG jin (Institute of Immunology PLA, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To identify the human CD55 displayed on the surface of yeast and explore the effect of inducing duration on its display. **Methods** The human CD55 open reading frame was cloned with PCR from CD55-pBluescript M13-(Amp+) plasmid, then subcloned into the yeast surface displaying vector pYD1. The recombinant vector was transformed into yeast cell EBY100. The yeast cells displaying CD55 were mixed with normal human serum. CD55 and cell associated the terminal complement complex (TCC) were monitored with fluorescence microscopy and flow cytometry. Yeast diplaying CD55 at different time point were analyzed with flow cytometry. **Results** CD55 displayed on the surface of yeast bound with anti-CD55 McAbs and decreased TCC on cells surface. The percentage of cells displaying huaman CD55 was highest after the cells were induced for about 20 h. **Conclusion** CD55 displayed on the surface of yeast have immunological and biological activity.

Key words: human CD55; complement regulatory protein; yeast surface display

CD55又称衰变加速因子(Decay-accelerating factor, CD55)是一种广泛分布于与血清相接触的多种细胞表面的补体调节蛋白。已知导致阵发性夜间血红蛋白尿(Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, PNH)的原因即是病人红细胞表面缺乏CD55和CD59[1]。近年来,最为引人注目的是发现通过转基因动物技术将人CD55分子等补体调节蛋白表达于异种动物(通常选择猪)的细胞表面,可以有效抑制人体补体系统对异种器官的超急性排斥反应[2]。然而有限的抑制能力及缺乏I因子的辅因子活性限制了CD55的临床应用。已有多篇噬菌体呈现技术用于改造蛋白质亲和力的研究报道,但由于人CD55是真核细胞膜上蛋白,其活性的发挥需要真核细胞的体内修饰,因此我们拟尝试用真核呈现系统——酵母表面呈现技术,筛选高活性的CD55。本实验报道了酵母表面呈现的天然CD55分子的活性鉴定结果及不同诱导时间对呈现蛋白的影响,为下一步利用酵母表面呈现技术改造CD55分子奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 质粒和菌株

CD55-pBluescript M13-(Amp+)质粒,含有1 848 bp的编码人CD55蛋白完整开放阅读框的cDNA pBluescript M13重组质粒,由访美学者馈赠。*E. coli* DH5α为本所保存。酵母呈现载体pYD1及酵母宿主菌株EBY100均购自Invitrogen公司。

1.2 主要试剂

限制性内切酶购自New England公司,Taq酶及T4 DNA连接酶购自Promega公司。针对CD55不同表位的单抗DG3、DG9、DA11由本室制备[3]。抗C_{5b-9}单抗aE11为DAKO公司产品。FITC-山羊抗小鼠IgG购自北京中山生物技术有限公司。

1.3 含CD55基因的酵母表面呈现载体的构建

根据已报道的人CD55 cDNA序列,设计并合成以下引物,P1:5'-CG GGATCC GAC TGT GGC CTT CCC CCA GAT G-3',P2:5'-CCG GAATTC ACG GGT AGT ACC TGA AGT GGT TCC-3',其中P1含有*BamH*I酶切位点,P2含有*EcoR*I酶切位点。以CD55-pBluescript M13-(Amp+)质粒为模板PCR扩增出全长CD55成熟蛋白的开放阅读框序列(无信号肽和GPI锚形成前被切掉的

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30080032);重庆市科委重点攻关课题
作者简介:郭 波(1972-),男,湖南省株洲市人,博士研究生,主要从事分子免疫学方面的研究。电话:(023)68752238
收稿日期:2000-09-25;修回日期:2001-03-16

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

氨基酸开放阅读框序列)。测序鉴定后酶切克隆到酵母呈现载体 pYD1,转化 *E. coli* DH5α。回收穿梭载体 CD55-pYD1,按 Gietz 等方法转化 EBY100[4]。

1.4 酵母表面呈现 CD55 的诱导[5]

挑取单个酵母克隆入 2 ml 含有 2% 葡萄糖的 YNB-CAA 培养基中,30 ℃振荡培养过夜至 D_{600}= 2~5。(3 000~5 000)× *g* 离心 5~10 min。用含有 2% 半乳糖的 YNB-CAA 培养基重悬细胞至 D_{600}= 0.5~1。保留 0.5 D_{600}单位的细胞于 4 ℃作为 0 时相点。将细胞培养物在 20~25 ℃振荡培养,分别取不同时相点的细胞培养物,移出 0.5 D_{600}单位的细胞,储存于 4 ℃。

1.5 间接荧光标记检测酵母表面呈现的 CD55

分别用针对 CD55 不同表位的 3 株单抗对酵母表面呈现的 CD55 进行检测。操作如下:将收集的细胞(3 000~5 000)× *g* 离心 5~10 min。用 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)重悬细胞,(3 000~5 000)× *g* 离心 5~10 min。移去 PBS,重悬细胞于 50 μl PBS, 1 mg/ml BSA, 1 μl 一抗。冰上孵育 30 min。(3 000~5 000)× *g* 离心 5~10 min。PBS 洗涤细胞 2 次。重悬细胞于 50 μl PBS, 1 mg/ml BSA, 1 μl FITC 标记抗鼠 IgG 二抗。避光冰上孵育 30 min。1 ml PBS(无 BSA)洗涤细胞两次。重悬细胞于 40 μl 1× PBS,点 5~10 μl 载玻片上,盖上盖玻片,荧光显微镜下观察并照相。

1.6 流式细胞仪检测酵母表面 TCC 的沉积

将收集的细胞(3 000~5 000)× *g* 离心 5~10 min。用 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)重悬细胞,(3 000~5 000)× *g* 离心 5~10 min。加入正常人血清,37 ℃孵育 30 min,PBS 洗涤细胞 2 次。按常规程序相继加入抗 C_{5b-9}抗体,FITC 标记二抗,FACS 检测。

1.7 流式细胞仪检测不同时相点表达 CD55 的细胞百分率

按常规方法进行。

2 结果

2.1 荧光标记检测酵母表面呈现的 CD55

经测序鉴定,克隆的 CD55 cDNA 序列与 Genebank 的全长 CD55 分子一致(结果未显示)。呈现载体转化酵母后,经诱导表达,分别用针对 CD55 不同表位的 3 株单抗 DG3、DG9、DA11 作为一抗,FITC 标记的抗鼠 IgG 作为二抗对酵母细胞进行染色。CD55-pYD1 质粒转化的 EBY100 酵母细胞着染强亮度的荧光,未转化的 EBY100 以及转化有载体 pYD1 的 EBY100 则未着染荧光。表明在酵母细胞 EBY100 表面表达的 CD55 分子具有与其单抗结合的能力(图 1 显示了 CD55-pYD1 质粒转化的 EBY100 酵母细胞对单抗 DG3 的间接免疫荧光染色结果)。

2.2 流式细胞仪检测酵母表面 TCC 的沉积

为了研究酵母表面呈现的 CD55 分子的生物学活性,我们以正常人血清处理酵母细胞,由于酵母表面的多糖能活化补体并在酵母表面形成 C_{5b-9}[6],而 CD55 可使 C_3/C_5 转化酶衰变,减少 C_{5b-9}的形成。通过检测酵母表面的 C_{5b-9}变化情况可反应 CD55 的生物学活性。图 2 显示 CD55 呈现细胞与空载体转化细胞表面的 C_{5b-9}的 FACS 检测结果。表达 CD55 的细胞(图 2A、C)C_{5b-9}明显减少。

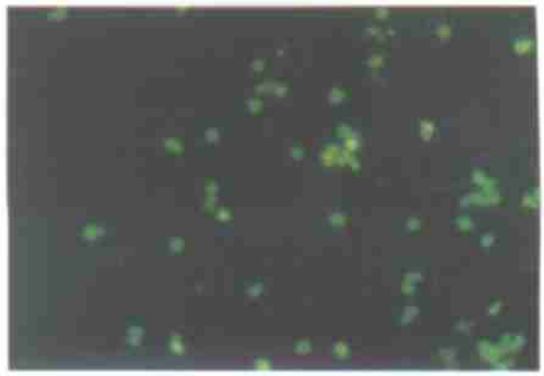


图 1 呈现 **CD55** 的酵母细胞的荧光显微图像 (× 400)

Fig 1 Fluorescence microscopic image of yeast displaying CD55 (× 400)

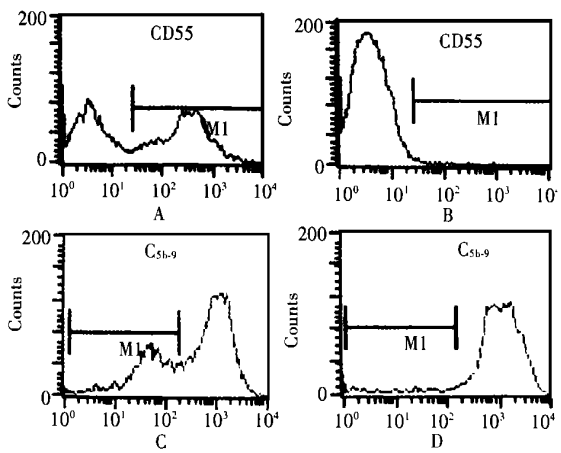


图 2 酵母细胞表面呈现的 **CD55** 及 C_{5b-9} 的 **FACS** 检测

Fig 2 Flow cytometric analyses of yeast diplaying CD55 and C_{5b-9}

The yeasts ware induced in galactose medium at 20 ℃ for 20—24 h, mixed with normal human serum at 37 ℃. Cells were stained with McAb DG3 or aE11, followed by FITC-labeled goat anti-mouse IgG; A: yeast/CD55-pYD1+DG3; B: yeast/pYD1+DG3; C: yeast/CD55-pYD1+aE11; D: yeast/pYD1+aE11

2.3 流式细胞仪检测不同时相点表达 CD55 的细胞百分率

为了研究不同诱导时间与酵母细胞表面呈现 CD55 的关系,我们分别取不同时相点的酵母细胞,用 FACS 检测表面呈现 CD55 的细胞的百分率,结果如图 3 所示。在以上所描述的诱导条件下,随着时间的延长,细胞表面表达 CD55 分子的细胞逐渐增多,当诱导时间达到 20 h,呈现 CD55 的细胞达到总细胞数的 57% 左右,继续延长诱导时间,百分率升高不明显。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

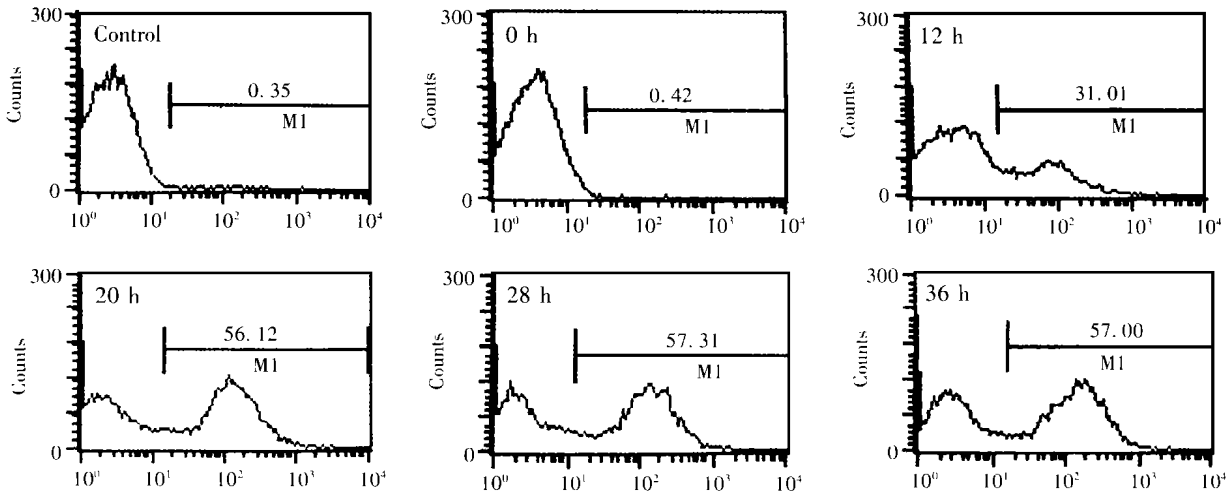


图 3　不同时相点表面呈现 **CD55** 的酵母细胞的 **FACS** 检测

Fig 3　Flow cytometric analyses of yeast diplaying CD55 at different time point

The yeast/CD55-pYD1 was induced in galactose medium at 20 ℃ for 0, 12, 20, 28, 36 h. Cells were stained with McAb DG3, followed by FITC-labeled goat anti-mouse IgG.

3　讨论

CD55 是一分子量约 70×10^3 的 GPI 锚固糖蛋白, 广泛分布于与血清相接触的多种细胞表面, 通过阻断补体两条激活途径中 C_3/C_5 转化酶的组装以及促进其衰变, 保护自身宿主细胞免受补体系统的攻击。除参与 PNH 的发病机制外, CD55 的表达异常在生殖免疫、肿瘤免疫、自身免疫性疾病等病理生理过程中的也发挥重要作用。细胞表面表达人 CD55 分子的转基因动物可以有效抑制人体补体系统对异种器官的超急性排斥反应[2]。

然而, 有限的抑制能力及缺乏 I 因子的辅因子活性限制了 CD55 的临床应用。另外, CD55 是一些病毒的受体, 比如: 埃可病毒、柯萨奇病毒。这些病毒有可能更易于通过表达有 CD55 的宿主动物器官传染给人[7]。近来国外用缺失突变方法来去除病毒结合表位已取得了一些进展[8], 然而运用最广的还是表面呈现技术。

自丝状噬菌体表面呈现技术创立起来以后, 表面呈现技术的发展日新月异。短短几年, 不同的实验室又分别发展多种表面呈现系统。在高亲和力抗体及多肽药物的的筛选、蛋白质抗原表位分析等许多方面得到了广泛应用。

酵母是真核细胞, 含有与哺乳动物相似的蛋白折叠机制, 比原核细胞更有可能正确的表达和呈现人的蛋白。其次, 不象噬菌体, 酵母是个足够大的颗粒, 它们可用流式细胞仪进行筛选和分离, 这就使得基于特异的定量的亲和力改变的突变体的分离成为可能[9]。因此, 我们拟选择酵母表面呈现系统对 CD55 分子进行改造。

然而用酵母表面呈现技术对 CD55 分子进行改造的前提是天然的 CD55 分子能在酵母表面正确表达并具有活性。我们以本室制备的分别作用于人 CD55 SCR3、SCR1 及 SCR43 的单抗 DG3、DG9 及 DA11 对表面呈现的 CD55 进行检测, 证实了酵母表面呈现的 CD55 分子具有免疫学活性。用抗 $C_{5b\text{-}9}$ 单抗检测补体活化后酵母表面 $C_{5b\text{-}9}$ 的变化情况, 证实了表面呈现的 CD55 具有生物学活性。同时为了探讨诱导时间对 CD55 呈现的影响, 我们运用 FACS 分析了不同时相点的细胞表达百分率, 得出最佳诱导时间为 20 h。以上结果为用酵母呈现技术改造 CD55 分子奠定了坚实的基础。

参考文献:

[1] Nishimura J, Murakami Y, Kinoshita T. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: An acquired genetic disease[J]. Am J Hematol, 1999, 62(3): 175—182.

[2] Chen R H, Naficy S, Logan J S, *et al*. Hearts from transgenic pigs constructed with CD59/DAF genomic clones demonstrate improved survival in primates[J]. Xenotransplantation, 1999, 6(3): 194—200.

[3] 邹　强, 谢佩蓉, 郑　萍. 抗人 DAF 单克隆抗体的制备及鉴定[J]. 免疫学杂志, 1999, 15(2): 122—124.

[4] Gietz R D, Schiestl R H. Transforming yeast with DNA[J]. Methods Molecular Cellular Biology, 1995, 5(5), 255—269.

[5] Kieke M C, Cho B K, Boder E T, *et al*. Isolation of anti-T cell receptor scFv mutants by yeast surface display[J]. Protein Eng, 1997, 10(11): 1 303—1 310.

[6] Munk M E, Da Silva W D. Activation of human complement system *Paracocidioides brasiliensis* and its deposition on the yeast form cell surface[J]. J Med Vet Mycol, 1992, 30(6): 481—484.

[7] Mollnes T E, Fiane A E. Xenotransplantation: how to overcome the complement obstacle[J]? Mol Immunol, 1999, (36): 269—276.

[8] Begum N A, Murakami Y, Mikata S, *et al*. Molecular remodelling of human CD46 for xenotransplantation: designing a potent complement regulator without measles virus receptor activity[J]. Immunology, 2000, 100(1): 131—139.

[9] Boder E T, Wittrup K D. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries[J]. Nat Biotechnol, 1997, 15(6): 553—557.

（编辑　谢义霞）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net